



**UNIVERSITE DE LIEGE  
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIES ET DES  
EQUIDES  
SERVICE D'OBSTETRIQUE ET PATHOLOGIES DE LA REPRODUCTION DES ANIMAUX DE  
COMPAGNIE ET DES EQUIDES.**

**MISE AU POINT DE TECHNIQUE D'ELEVAGE DE FAUX  
BOURDONS EN BELGIQUE ET DE LA CRYOPRESERVATION DE  
LEURS GAMETES**

**OPTIMIZING DRONE RAISING IN BELGIUM AND SEMEN  
CRYOPRESERVATION TECHNIQUES**

**Sophie EGYPTIEN**

**MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU CERTIFICAT DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES VETERINAIRES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2018-2019**

## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, je souhaite remercier Professeur Stefan Deleuze, promoteur de ce travail, pour m'avoir donné l'opportunité de développer ce travail, pour ses conseils, sa guidance, ses corrections et surtout sa gentillesse.

Merci à Pierre-Hubert Andrieux pour les ruches, sans lui ce projet ne serait pas né.

Ensuite, un grand merci à Danielle et Richard du rucher école de la FRPLA pour leur enseignement et conseils apicoles, leur aide, le prêt de matériel et puis surtout pour leur amitié, et présence au quotidien.

Merci Joelle pour son aide et sa discussion sur les fluorochromes et différents essais de colorations vitales.

Merci Benjamin pour le travail de cytométrie en flux.

Merci à Flore pour sa compagnie quotidienne, son travail, son aide avec les abeilles, de reprendre les gardes quand les abeilles ont décidé de faire ressembler mes mains à celles d'un bonhomme Michelin.

Merci à Remy pour sa patience face à mon incompétence en bricolage, pour l'aide dans les abeilles et pour tout le matériel fabriqué/bricolé.

Merci à Sonia pour son soutien, surtout les jours de coups durs. Merci à Carine et Luna pour les balades.

Je remercie mes collègues de bureau Marie, Natacha et Sylvie pour leur soutien et puis de tolérer mon désordre permanent.

Merci Julie, Julien, Michel et les amis du jeudi pour les soirées et leurs lendemains...

Merci Mich pour tout son soutien apporté depuis de nombreuses années.

Enfin, merci à Adrien d'être là près de moi tous les jours, pour ses encouragements, son aide, sa présence, son soutien, mon alimentation, sa patience, sa tolérance, son raisonnement scientifique.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

CASA : Computer Assisted Semen Analysis

DMSO : dimethylsulfoxyde

FITC: Isothiocyanate de fluorescéine

PI : Propidium iodide

VHS: Varroa Sensitive Hygiene

## **TABLE DES MATIERES**

RESUME.....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCTION.....	3
1. Contexte .....	3
2. Apidologie générale .....	3
2.1 L’abeille.....	4
2.1 La colonie et la ruche .....	4
2.3 L’alimentation .....	5
3. Physiologie de la reproduction .....	5
4. Conservation de la semence .....	6
5. Critères de qualités de semence.....	7
MATERIEL ET METHODES .....	8
1. Les colonies.....	8
2. Elevage de mâles : essai 1 .....	8
2.1 Mise en ponte : saison apicole 2018.....	8
2.2 Encagement du cadre à mâles.....	8
2. 3 Marquage des mâles .....	8
3. Elevage de mâles : Essai 1.1 .....	8
3.1 Mise en ponte : saison apicole 2018.....	8
3.2 Encagement du cadre à ouvrière.....	8
3.3 Marquage des mâles et encagement des mâles.....	8
4. Elevage de mâles : essai 2 .....	8
4.1 Mise en ponte : saison apicole 2018.....	8
4.2 Encagement des mâles.....	9
4.3 Marquage des mâles .....	9
5. Elevage de mâles : essai 3 .....	9
5.1 Les colonies : saison apicole 2019 .....	9
5.2 Mise en ponte .....	9
5.3 Encagement des mâles.....	9
6. Collecte de semence .....	9
7. Congelation .....	10

8. Essai d'analyse en cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence – Coloration vitale SYBR-14 / PI.....	10
8.3 Collecte de la semence .....	10
8.2 Dilution de la semence .....	10
8.3 Coloration vitale .....	10
RESULTATS .....	12
1. Elevage de mâle : essai 1 .....	12
2. Elevage de mâle : essai 1.1 .....	12
3. Elevage de mâles : essai 2 .....	12
3. Elevage de mâles : essai 3 .....	12
4. Collecte de semence .....	12
4.1 Mâles d'âge connus .....	12
4.2 Mâles d'âge inconnus .....	13
5. Essai de congélation .....	13
6. Cytométrie en flux.....	13
7. Microscopie à fluorescence .....	14
DISCUSSION .....	15
1. Méthodes d'élevage.....	15
2. Collecte de semence .....	17
3. Coloration vitale .....	18
Bibliographie .....	21

## **RESUME**

La conservation de la semence de faux bourdons s'inscrit dans un intérêt scientifique mondial croissant. Il est crucial en termes de sélection et de conservation de la biodiversité de pouvoir conserver un potentiel génétique exploitable et mondialement transportable. Afin d'améliorer la qualité de la semence en post-décongélation, certains paramètres restent à évaluer. L'influence de l'âge au moment de la collecte est l'un des critères. Pour l'évaluer il est important de développer une méthode d'élevage permettant d'obtenir un grand nombre de mâles d'âge connu tout en conservant l'équilibre de la colonie. Ce travail décrit le développement d'une méthode d'élevage de mâles encagés d'âge connus. Celle-ci remplit l'objectif d'équilibre stable de la colonie. Le travail rapporte également les premiers essais de congélation de semence. La cytométrie en flux peut évaluer différents critères de qualité de semence dans de nombreuses espèces domestiques, cette technique est utilisée chez le faux bourdon pour évaluer la viabilité en utilisant notamment les marqueurs SYBR-14 et propidium iodide. Les résultats sont difficiles à interpréter et la validation est en cours grâce aux images d'épifluorescence. Il est nécessaire de confirmer les résultats d'élevage en répétant la méthode la saison prochaine et évaluer la qualité de la semence de décongélation.

Mots-clés : Faux-bourdons, élevage, cryopréservation, semence, cytométrie en flux

## **SUMMARY**

Honeybee semen conservation is of worldwide scientific interest with increasing urgency to improve results in order to conserve biodiversity. Gamete cryopreservation from selected lines is of growing interest also. Indeed, selection of bees tolerant to varroa is one of the main actual objectives in honeybee research. Cryobanking of these gametes will be exploitable internationally by simple transport. In order to improve cryopreservation, different parameters are studied such as influence of drone age. To study this criterion, we need a method to raise large numbers of drones of known age without impairing the colony's stability. We also need objective characteristics of semen quality. One of these is semen viability studied by epifluorescence or flow cytometry using SYBR-14 and propidium iodide dyes. This report describes the development of this technique and first attempts of cryopreservation. It also details the first steps of validation of the fluorescent supravital staining by flow cytometry as a reference to test new dyes. We can conclude that the rearing method allows to raise large numbers of drones of known age and needs to be tested again during the next breeding season and that the flow cytometry technique needs to be further validated with comparison to epifluorescence microscopy.

Drones, Rearing, Semen, Cryopreservation, Flow cytometry

# **INTRODUCTION**

## **1. Contexte**

L'abeille domestique, *Apis mellifera* Linnaeus trouve son origine au Moyen Orient, elle s'est étendue par 4 lignées traditionnellement appelées A (Africa), M (Europe de l'Ouest et du Nord), C (Europe de l'Est et du Sud) et O (Moyen Orient et Asie). Les 29 sous espèces d'*Apis mellifera* connues à ce jour dérivent toutes de ces 4 lignées (Leclercq et al., 2018). Les sous-espèces se sont adaptées à leur environnement. Depuis le début du 17<sup>ème</sup> siècle, *A. mellifera* L. a été exportée dans le monde entier. Ce sont les hommes qui lors de leurs migrations ont déplacé les colonies d'abeilles avec eux (Crane, 1999). On retrouve l'abeille domestique aujourd'hui sur tous les continents sauf l'Antarctique. Son impact sur l'agriculture est très significatif, c'est le principal pollinisateur de nos cultures de céréales et la principale espèce élevée pour la production de miel. Entre 1961 et 2006, dans nos pays développés, la dépendance de l'industrie agricole aux pollinisateurs a augmenté de 50% (Van Engelsdorp and Meixner, 2010). De nombreuses publications scientifiques reportent que la population d'*Apis mellifera* est en déclin en Europe et Amérique du Nord (Potts et al., 2010; Vanengelsdorp et al., 2009). Il est donc urgent de développer et améliorer les méthodes de conservation de l'abeille domestique.

La sous-espèce d'Europe de l'ouest, l'abeille noire, *Apis mellifera mellifera*, subit des hybridations avec d'autres sous-espèces importées comme *Apis mellifera carnica*. Ces croisements liés à l'intervention humaine augmentent la diversité génétique ce qui modifie les caractéristiques naturelles adaptées à leur environnement. Certains pays comme la Belgique, l'Irlande et le Royaume-Unis promeuvent la conservation de ce qu'il reste de la génétique de l'abeille noire.

Un autre grand intérêt pour la conservation est lié à la sélection. A l'heure actuelle, la tendance est à la sélection d'une abeille « varroa sensitive hygiene » (VSH), l'abeille tolérante au varroa. La sélection a d'abord été faite sur les reines mais de plus en plus, la sélection se fait sur les mâles également, il y a donc un intérêt croissant pour la conservation de semence de mâles issus de colonie VSH.

De manière générale, conserver la génétique animale est possible soit en gardant l'animal vivant comme cela se fait en zoo par exemple, ou par la conservation de cellules animales vivantes.

L'échange international d'animaux vivants est complexe et leur transport peut s'avérer être délétère.

Cela augmente également le risque de propagation de maladies et parfois, c'est simplement illégal.

Dans ce contexte, l'échange de matériel génétique sous forme cellulaire, par exemple de gamètes, est à préférer car plus simple et moins risqué. La cryopréservation de spermatozoïdes est plus aisée que celle d'ovocytes du fait de leur faible teneur en eau. Le transport mondial de semence congelée est une pratique commune pour de nombreuses espèces domestiques et a également déjà été réalisé avec de la semence d'*Apis mellifera* (Weybright, 2016).

## **2. Apidologie générale**

Le présent travail s'intéresse à l'abeille domestique, les caractéristiques décrites s'y rapportent.



## 2.1 L'abeille

L'abeille est un hyménoptère apocrite, le premier segment est fusionné au thorax et suivi d'un étranglement qui le sépare de l'abdomen (« taille de guêpe »), appartenant à la super famille des *Apoïdes* et plus précisément à la famille des *Apinae*.

### 2.1 La colonie et la ruche

Une colonie d'abeilles *Apis mellifera* est composée de 3 types d'individus : la reine, les ouvrières (entre 20000 et 50000) et les faux-bourçons (quelques centaines, du printemps à l'automne). La reine a pour rôle de produire la descendance et maintenir une cohésion dans la ruche. Les ouvrières jouent un rôle évolutif en fonction de leur âge. Les mâles assurent la reproduction sexuée.

Dans les cellules des cadres, la reine pond des œufs, fécondés ou non, qui éclosent et deviennent des larves, c'est le couvain ouvert. Les ouvrières les nourrissent avant d'operculer les cellules dans lesquelles les nymphes continuent de se développer jusqu'à l'émergence. C'est le couvain operculé. La figure 1 montre les différents aspects du couvain. On peut voir que les cellules de mâles sont plus grandes que celles de femelles et que lorsqu'elles sont operculées, celles de mâles sont bombées alors que celles des femelles sont planes.

Depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, l'élevage se fait en ruche avec des cadres amovibles. Ceci permet un contrôle et une observation précise du développement de la colonie. Une ruche possède en son corps entre 10 et 12 cadres, la ruchette n'en possède généralement que 6. La ruche de type Dadant, modèle choisi dans le cadre de ce travail, se construit comme suit : le plancher, le corps de ruche, la grille à reine, la hausse, le couvre cadre et le toit (figure 2). Dans les cadres de corps se trouvent le couvain, le nectar et le pollen. Dans la hausse, les abeilles stockent l'excédent de miel.

Il existe différents outils pour limiter le mouvement de la reine au sein de la ruche. Tout d'abord, la grille à reine qui est placée entre le corps et la hausse pour l'empêcher de pondre dans les cadres de hausse. Ensuite, une grille à reine verticale peut remplacer un cadre pour bloquer la reine dans une partie du corps. Enfin, il existe des cages à reine. Le cadre de corps peut lui-même être encagé (figure 3, à gauche) ou la reine seule dans une petite cage accrochée à un cadre.

Afin de diminuer la consommation énergétique des abeilles, les cadres sont placés dans la ruche avec une cire gaufrée. Le gaufrage donne la forme et la taille des cellules. Les abeilles produisent de la cire pour former les cellules en suivant le contour du gaufrage, on dit qu'elles « étirent » les cadres. Les deux tailles de gaufrage existent, les grandes pour mâles et les petites pour femelles. Les abeilles peuvent choisir d'étirer les cellules pour femelles en cellules pour mâles, mais l'inverse n'est pas observé.

La visite de la ruche par l'apiculteur n'est possible qu'à des températures minimales de 15°C. En effet, la visite diminue la température à l'intérieur de la ruche. Le manipulateur doit être attentif à ce que les ouvrières puissent compenser la perte calorifique engendrée sous peine de mortalité du couvain.

### 2.3 L'alimentation

Les abeilles se nourrissent naturellement de nectar et de pollen et de gelée, qu'elles produisent à partir des deux premières ressources récoltées lors de leurs vols à des températures supérieures à 12 °C. La reine est nourrie de gelée royale par les ouvrières accompagnatrices. Les mâles ne possèdent pas le niveau d'enzyme digestive nécessaire à leur survie. Ils consomment très peu de pollen par eux-mêmes et seulement les quelques premiers jours postémergences. Les ouvrières les nourrissent avec une alimentation prédigérée à base de nectar et de pollen (Hrassnigg and Crailsheim, 2005). Les ouvrières quant à elle ingurgitent de grandes quantités d'aliments afin de subvenir à leurs propres besoins mais également à ceux du couvain, de la reine et des faux-bourçons.

L'alimentation artificielle apportée par l'apiculteur se compose de sucre, de pollen, de miel et d'eau mélangés en proportion variables pour former du sirop, du candi ou de l'eau miellée. Le sirop est un mélange de sucre fin et d'eau chauffé, le produit est visqueux. Le candi est mélange de sucre impalpable, de miel et d'eau pour obtenir une pâte molle. L'eau miellée est mélange de miel et d'eau afin d'obtenir une consistance plus fluide que celle du miel pur.

### 3. Physiologie de la reproduction

Deux niveaux de reproduction sont décrits pour les abeilles, la reproduction des individus et de la colonie. Au niveau de la colonie, lorsque la colonie est forte, dès que les ouvrières ont terminé d'élever une nouvelle reine, c'est-à-dire lorsque la cellule royale est operculée, l'ancienne reine quitte la ruche avec une partie de la colonie, c'est l'essaimage.

Ce travail s'intéresse à la reproduction au niveau individuel. Après l'hiver, la reine reprend la ponte vers la mi-mars. La reine et les ouvrières sont issues d'œufs fécondés. Entre la ponte et l'éclosion, 21 jours s'écoulent pour les ouvrières contre 16 pour une reine. Les mâles ou faux bourçons, sont issus d'œufs non-fécondés et se développent par parthénogenèse. Les mâles émergent 24 jours après la ponte. Ils sont plus grands que les ouvrières. Dans nos régions, la ponte d'œufs non fécondés commence fin avril dès que la colonie est suffisamment forte, avec une population dense au sein de la ruche.

Ce qui différencie le devenir des œufs fécondés, c'est-à-dire la caste à laquelle la femelle en devenir appartiendra, est l'alimentation prodiguée à la larve à partir de son 4<sup>ème</sup> jour jusqu'à l'operculation. La larve de reine est nourrie de gelée royale, alors que la larve d'ouvrière tout comme celle du faux bourdon reçoit un mélange d'eau, de pollen, de miel et de gelée royale.

La maturité sexuelle de la reine est atteinte généralement 5 à 6 jours après l'éclosion (Cobey et al., 2013). Le système reproducteur des ouvrières est inhibé par les phéromones de la reine. Au moment de l'éclosion des faux bourçons, la spermatogenèse est complète. Durant la première semaine de vie, le sperme migre des testicules vers les vésicules séminales où a lieu la maturation finale (Collins et al., 2006). Sur base de ces informations, l'âge de maturité sexuelle du mâle communément admise varie de 14 à 21 jours. Ils sont supposés matures si lors de l'éversion de l'endophallus, la paire de cornes apparaît jaune-orange. Sinon, elles sont transparentes (Cobey et al., 2013). L'âge du faux

bourdon influence la production de semence. Une source australienne rapporte une plus grande proportion d'éjaculat chez les mâles âgés de 35 jours que ceux de 21 et 14 jours (Rhodes et al., 2011). Ils ont une durée de vie potentielle de plusieurs mois mais ne survivent généralement pas à l'hiver. Ils ne peuvent se nourrir seuls. Ils sont chassés de la ruche par les ouvrières dès que les ressources alimentaires se font plus rares (juillet-août) car leur seul rôle étant d'assurer la fécondation de la reine, ils ne servent plus l'intérêt de la colonie l'automne venu.

La reine est fécondée lors d'un vol nuptial, généralement unique, par 10 à 25 mâles en moyenne. Les accouplements ont lieu en vol dans une zone géographique de rassemblement des mâles, une « aire de congrégation ». La semence est déposée dans les oviductes de la reine (Koeniger et al., 2011). Le système reproducteur mâle est intra-abdominal, l'éversion de l'endophallus ne permet pas un retour à la position physiologique. Le faux-bourdon ne survit donc ni à la saillie ni à la collecte de semence. Après l'éjaculation, les glandes à mucus libèrent leur contenu qui coagule à l'extrémité du vagin venant faire un bouchon dans la cavité du dard. Le mâle suivant libère le bouchon avant l'intromission de l'endophallus (Rotschild, 1954).

Un spermatozoïde de faux bourdon (Figure 4) a pour caractéristique d'être très long, mesurant de 250 à 270  $\mu\text{m}$  et filamenteux (Lino-Neto et al., 2000). Il ne possède pas de pièce intermédiaire (Rotschild, 1954). La tête mesure 5  $\mu\text{m}$  de long (Al-Lawati et al., 2009). A titre indicatif, la taille moyenne d'un spermatozoïde d'étalon, de taureau ou de verrat est de respectivement, 60,6  $\mu\text{m}$ , 53,5  $\mu\text{m}$ , et 55,6  $\mu\text{m}$  (García-Vázquez et al., 2016). Le mouvement d'un spermatozoïde de faux bourdon est circulaire (Al-Lawati et al., 2009) alors que celui de nos mammifères domestiques est rectiligne. Lorsque la semence est diluée, le mouvement général devient amiboïde (Tofilski, 2014), les queues des spermatozoïdes vibrent en phase. Il est suggéré que ce mouvement facilite la migration vers la spermathèque (Tofilski, 2014) où ils sont conservés toute la durée de vie de la reine (2 à 5 ans en moyenne).

#### **4. Conservation de la semence**

La semence de faux bourdon possède des caractéristiques intrinsèques permettant une conservation de longue durée au-dessus de la température de congélation puisque la semence est conservée dans la spermathèque pour la durée de vie de la reine. Cependant, lorsqu'on étudie l'évolution de qualité de la semence conservée à 14 °C au cours du temps, une diminution significative de la qualité de la semence est constatée après 180 jours. Cet essai comparatif a été réalisé sur semence décongelée, il n'y a pas d'évolution de la qualité post décongélation en fonction du temps que la paillette a passé dans l'azote liquide. La congélation-décongélation impacte la qualité une seule fois (Paillard et al., 2017).

Différents facteurs influencent la viabilité de la semence décongelée : la composition du milieu de dilution, le choix du cryoprotectant et sa concentration, la vitesse de réfrigération, le protocole de décongélation, ... (Hopkins and Herr, 2010). La réfrigération lente avec le DMSO (diméthylsulfoxyde) comme cryoprotectant montre des résultats encourageants en terme de mobilité et viabilité post-décongélation (Hopkins et al., 2012).

## **5. Critères de qualités de semence**

Quatre critères principaux sont généralement étudiés pour caractériser la qualité de la semence.

Les deux premiers sont le volume et la concentration qui sont liés chez le faux bourdon à la taille de l'abdomen, au poids ainsi qu'à l'état de santé (Couvillon et al., 2010; Schlüns et al., 2003; Vasfi Gençer and Kahya, 2011).

Le troisième est la mobilité spermatique. L'utilisation du CASA (Computer Assisted Semen Analysis) n'est pas applicable pour la semence de faux bourdon. La tête du spermatozoïde est difficilement différenciable de la queue et les mouvements sigmoïdes de la queue donnent une mobilité majoritairement circulaire et non rectiligne (Wegener et al., 2012). La mobilité est évaluée de manière subjective.

Le quatrième critère est celui de la viabilité des spermatozoïdes qui est évaluable par cytométrie en flux et par microscopie à épifluorescence en utilisant notamment les fluorochromes SYBR-14 et propidium iodide (PI) (Rzymiski et al., 2012). La coloration PI n'est possible qu'au travers d'une membrane endommagée. Le colorant se fixe sur les acides nucléiques et renvoie une lumière fluorescente rouge après excitation. SYBR-14 est un colorant perméable aux membranes, il se fixe également au niveau des acides nucléiques et colore donc toutes les têtes des spermatozoïdes en vert après excitation lumineuse (Martínez-Pastor et al., 2010).

## **MATERIEL ET METHODES**

### **1. Les colonies**

Trois colonies (N2, N3, N4) de sous espèce *Apis mellifera carnica* sont fournies par un apiculteur privé. Les ruches sont de type Dadant 10 cadres de marque NICOT®. La 4<sup>ème</sup> colonie (N1) est née d'une reine fille d'une des 3 autres colonies.

### **2. Elevage de mâles : essai 1**

#### **2.1 Mise en ponte : saison apicole 2018**

A partir de la fin du mois d'avril, les cadres à mâles non étirés sont placés en rive du couvain présent dans les colonies (N2-N4) pour que les ouvrières les étirent.

Après plusieurs jours, les reines pondent librement les cadres à mâles sur une durée moyenne d'une semaine.

#### **2.2 Encagement du cadre à mâles**

Une cage permettant d'enfermer un cadre de corps est installé dans une ruchette Dadant 6 cadres (figure 3). La ruchette est construite comme suit : de gauche à droite : un cadre de corps à bâtir, un cadre à mâles encagé, un cadre de couvain operculé et un cadre de nourriture (figure 5, gauche). Le cadre à mâles est encagé, 1 jour avant la naissance des premiers mâles.

#### **2.3 Marquage des mâles**

De manière journalière, le cadre à mâles est extrait de la cage. Les mâles sont marqués d'un point de couleur sur la face dorsale du thorax à l'aide d'un marqueur POSCA®. Chaque jour, la couleur change (figure 6). Le cadre est ensuite replacé dans la cage avec les faux bourdons toujours dessus.

### **3. Elevage de mâles : Essai 1.1**

#### **3.1 Mise en ponte : saison apicole 2018**

La méthode décrite au point 2.1 est utilisée.

#### **3.2 Encagement du cadre à ouvrière**

Un cadre à couvain d'ouvrières est encagé (figure 5, droite).

#### **3.3 Marquage des mâles et encagement des mâles**

De manière journalière les mâles non marqués présents sur le cadre à mâles sont marqués d'un point de nouvelle couleur (figure 6) et puis placés sur le cadre à ouvrières. Le cadre est ensuite réencagé avec les mâles nouvellement marqués.

### **4. Elevage de mâles : essai 2**

#### **4.1 Mise en ponte : saison apicole 2018**

La méthode décrite au point 2.1 est utilisée.

#### 4.2 Encagement des mâles

Le corps de la ruchette est placée sur une hausse. Une grille à reine est placée entre le corps et la hausse, empêchant la sortie des mâles. La ruchette est organisée comme suit : un cadre de nourriture, un cadre de couvain d'ouvrières, 3 cadres de couvain de mâles, une partition (figure 7).

#### 4.3 Marquage des mâles

Tous les jours les cadres sont visités, tout mâle non coloré est marqué d'un point de couleur au marqueur comme décrit ci-dessus (figure 5). A chaque jour correspond une couleur.

### **5. Elevage de mâles : essai 3**

#### 5.1 Les colonies : saison apicole 2019

Deux des 3 colonies (N2 et N3) précédemment utilisées sont les mêmes. La 3<sup>ème</sup> colonie (N1) utilisée est celle issue d'une reine nouvellement née d'une des 3 colonies initiales. Sa fécondation est naturelle.

#### 5.2 Mise en ponte

Le cadre de couvain sur lequel la reine se situe est placé au centre de la ruche à côté d'un cadre à mâle bâti. Les 2 cadres sont isolés du reste du couvain par 2 grilles à reine verticales pour une durée de 72 heures (figure 8).

#### 5.3 Encagement des mâles

La veille de la naissance des premiers mâles, le cadre de couvain de mâles est placé juste à côté du cadre de rive. Les mâles présents sur ces 2 cadres sont marqués à l'aide d'un marqueur POSCA<sup>®</sup>. Une grille à reine verticale est placée entre le cadre à mâles et le cadre à cages (figure 9) qui lui-même est placé contre le couvain (figure 10).

Ensuite, toutes les 24 heures, les nouveaux mâles présents sur les 2 cadres de rives sont encagés (figures 11 et 12) par nombre variant de 25 à 35 mâles par cage comme décrit précédemment (Stürup et al., 2013). Les cages sont conservées dans la ruche d'origine en rive du couvain jusqu'à la collecte de la semence.

Après encagement de tous les mâles, la grille à reine verticale est retirée et remplacée par un cadre d'ouvrières à étirer.

### **6. Collecte de semence**

La méthode appliquée est celle précédemment décrite et généralement recommandée (Ben Abdelkader et al., 2014; Cobey et al., 2013; Collins, 2004; Rhodes et al., 2011; Wegener et al., 2014b)

Les faux bourdons sont autorisés à voler dans une cage de grand format. La cage est maintenue à une température minimale de 30 °C et maximale de 35 °C. Une lampe à ultraviolets est placée au plafond afin de maintenir la température et stimuler le vol. Ce vol permet la défécation et ainsi limite la contamination de la semence lors de l'éjaculation.

Le faux bourdon est maintenu par la tête entre deux doigts. Une pression exercée sur la tête en direction du thorax permet l'éversion des deux crochets. Une pression supplémentaire de l'avant vers

l'arrière de l'abdomen dans le sens longitudinal permet l'éversion complète du bulbe (figure 13). La semence apparaît d'une couleur crème sur le mucus blanc nacré. Il est évité de contaminer la semence lors de l'éversion en touchant la semence. Les crochets apparaissent blancs transparents chez mâles immatures. La coloration orangée n'apparaît qu'après 4 à 6 jours postémergence (figures 14) (Koeniger et al., 1990).

La semence est collectée en utilisant l'appareil Schley®. Sa description se retrouve sur les figures 15 et 16.

## **7. Congelation**

La semence est diluée dans un milieu précédemment décrit à un ratio 5 de semence pour 1 de dilueur (Hopkins et al., 2012). Après dilution le milieu cryoprotectant est ajouté pour respecter le ratio 3 (semence diluée) : 2 (milieu cryoprotectant). Ce protocole de dilutions successives a été précédemment utilisé avec succès pour inséminer des reines (Hopkins et al., 2012).

Le volume final est monté en paillette de 250 µL comme suit : Coton – Dilueur – Air – Semence – Air – Dilueur – Poudre d'alcool polyvinylique (figure 17). La paillette est coupée pour obtenir une longueur totale de 8 cm.

La paillette est placée 2 heures dans un frigo avant d'être maintenue pendant 10 minutes, 7 cm au-dessus de l'azote liquide et enfin plongée dedans. La paillette est stockée dans l'azote liquide jusqu'à décongélation.

## **8. Essai d'analyse en cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence – Coloration vitale SYBR-14 / PI.**

### **8.3 Collecte de la semence**

La même méthode de collecte que décrite au point 6 est utilisée. La semence est conservée à température ambiante jusqu'à analyse (48 heures maximum).

### **8.2 Dilution de la semence**

Deux dilutions successives sont réalisées avant la coloration vitale : 1 µL de semence est dilué dans 200 µL de dilueur puis 50 µL de cette première dilution sont dilués dans 1200 µL de dilueur. Ceci constitue l'échantillon pour la coloration vitale.

### **8.3 Coloration vitale**

Les réactifs sont acquis chez Molecular Probes – ScienceFisher, le kit Live/Dead Sperm Viability (L-7011) est employé. Selon les recommandations du producteur, le propidium iodide (PI) 2,4mM est aliquoté et conservé à -20 °C sans dilution supplémentaire. Le colorant SYBR-14 a été dilué 1:50 dans le milieu HEPES-TALP (114 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 0,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,1 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,2 mM phénol rouge, 1,99 mM bicarbonate, 1 mM pyruvate, 36 mM lactate, 10 mg/mL gentamicine, 10 mM Hepes, 3 mg/mL albumine de sérum bovin) pour obtenir une concentration de 0,2 mM et conservé à -20 °C en aliquots. Les colorants sont décongelés à température ambiante juste avant leur utilisation.

300  $\mu$ L de l'échantillon pour la coloration vitale sont incubés avec 1,5  $\mu$ L de SYBR-14 (100nM) pendant 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière suivi de l'ajout de 1,5  $\mu$ L de PI (12  $\mu$ M) en suivant le même protocole d'incubation. Aucun rinçage n'est effectué avant analyse.

Afin d'avoir deux populations de spermatozoïdes, les morts et les vivants, un traitement thermique est appliqué à la moitié des échantillons. Ils sont plongés 10 min dans un bain marie à 60 °C puis laissés à température ambiante. Un deuxième traitement thermique comporte une étape préalable de 10 minutes dans l'azote liquide.



## **RESULTATS**

### **1. Elevage de mâle : essai 1**

La cage avec le cadre à mâle est rapidement devenue surpeuplée. L'ouverture journalière avec manipulation du cadre amène les mâles à s'envoler, la surpopulation est observée par de nombreuses mortalités dans la cage. De plus, lors des manipulations le cadre écrase des mâles.

### **2. Elevage de mâle : essai 1.1**

La technique précédente est légèrement modifiée. Les mâles marqués sont placés sur un cadre de couvain d'ouvrières en ouvrant le couvercle de la cage. De nombreux mâles s'envolent lors de la manipulation. La méthode est abandonnée.

### **3. Elevage de mâles : essai 2**

Les mâles sont marqués tous les jours. La coloration est bien tolérée par les femelles. Aucune agressivité envers les mâles marqués n'est constatée durant un mois. A la fin juin, les femelles ont chassé les mâles hors de la ruchette. Les forçant à passer à travers la grille à reine inférieure (figure 18). Les mâles sont morts étouffés.

Les mâles toujours vivants sont de petite taille par rapport à d'autres mâles de même âge s'étant échappé et vivant dans les colonies mères. Les mâles de taille normales éjaculent, les petits présentent de la diarrhée.

### **3. Elevage de mâles : essai 3**

3 colonies sont utilisées pour l'élevage des mâles en cages.

Les dates de naissances attendues et observées sont rapportées dans le tableau 1. Toutes les naissances sont observées avec 3 à 6 jours de retard sur la date attendue.

Les mâles marqués aux marqueurs POSCA® sont bien tolérés. Aucune agressivité n'est observée envers les mâles qu'ils soient marqués ou encagés. Les mâles décédés dans la cage avant récoltes sont réduits par les ouvrières, les antennes, têtes, ailes, pattes et parfois la tête sont retirées. L'abdomen est vidé. Les ouvrières essaient de sortir les cadavres des cages. Aucune sortie de cadavres n'est observée. Les ouvrières se déplacent aisément.

Le nombre de mâles encagés varie d'une colonie à l'autre. Le nombre exact par date et par colonie est rapporté dans le tableau 2.

Au moment de l'extraction des cages pour la récolte des mâles, de nombreuses ouvrières sont présentes dans les cages. Afin d'éviter leur présence au sein du laboratoire, elles sont chassées à l'aide de l'enfumoir et d'une plume.

### **4. Collecte de semence**

#### **4.1 Mâles d'âge connus**

Trois âges sont retenus pour la collecte de semence : 28, 35-36 et 41-42 jours postémersion.

Les colonies N1 et N2 permettent la récolte de mâles âgés de 28 et 35-36 jours. La colonie N4 permet la collecte de mâles âgés de 41-42 jours.

Le pourcentage de mâles vivants, le nombre ayant éjaculé, le volume éjaculé et le poids moyen en fonction de l'âge et de la colonie est rapporté dans le tableau 3.

La semence de la colonie 1 J35/36 a été observée au microscope afin d'évaluer si les spermatozoïdes apparaissaient mobiles. Les spermatozoïdes semblent souffrir rapidement de la dessiccation avec en périphérie de la goutte une absence totale de mobilité alors qu'au centre 20 % des spermatozoïdes sont mobiles.

#### **4.2 Mâles d'âge inconnus**

La première série de mâles collectés vient d'un rucher extérieur. Trois colonies sont échantillonnées. Le responsable de ce rucher suspecte que les mâles soient âgés de plus de 14 jours.

La deuxième série de mâles collectés vient de la colonie 1 de notre rucher. Les observations sont rapportées dans le tableau 4.

### **5. Essai de congélation**

Au vu du faible nombre de mâles produisant de la semence et donc du faible volume obtenu, la semence est congelée entièrement sans analyse préalable. Le protocole est légèrement modifié en cas de volume trop faible pour des raisons techniques.

Colonie 1 et 2 – J28 :

La semence est diluée 1 :1 puis à nouveau 1 :1 dans le milieu cryoprotectant. Un micro-capillaire est utilisé (figure 19) à la place d'une paillette de 250  $\mu$ L au vu du volume obtenu après dilution. Le montage du micro-capillaire est le même que celui précédemment décrit.

Colonie 2 – J35/36

Le protocole décrit dans le matériel et méthode point 7 est respecté.

### **6. Cytométrie en flux**

Lors d'un premier essai sur semence non traitée deux populations principales sont observées. Une troisième population très faible est présente. La première population est moyennement positive SYBR-14, une deuxième population hautement positive pour SYBR-14 et une troisième population moyennement positive SYBR-14 et hautement positive PI (figures 20 et 21).

Le deuxième essai montre des résultats similaires sur des spermatozoïdes tués par incubation 10 min à 60 °C. La population PI positive ne représente qu'un très faible pourcentage.

Un nouvel essai est réalisé en plongeant les spermatozoïdes dilués dans l'azote liquide avant de les réchauffer au bain marie à 60 °C. Une population PI positive est alors présente mais la population SYBR-14 moyennement positive et moyennement positive PI est toujours présente (figure 22).

Essai de triage des spermatozoïdes SYBR-14. On observe le même type d'image lors de la calibration sur les spermatozoïdes vivants. Après triage, l'échantillon est centrifugé mais aucun culot n'est visible. Une goutte est mise sous microscope et quelques rares spermatozoïdes sont vus. Les différentes populations observées sont donc des spermatozoïdes et non pas une contamination de l'échantillon.

## **7. Microscopie à fluorescence**

Le même protocole de coloration est utilisé avec les colorants SYBR-14 et PI. Une goutte est étalée sur lame et observée au microscope à épifluorescence Olympus BX51.

En l'absence d'un filtre Fluorescéine Isothiocyanate (FITC), 2 filtres sont nécessaires pour observer la coloration des spermatozoïdes. Certains sont positifs pour les 2 colorants (figure 23 gauche). La superposition des deux images en utilisant le programme ImageJ® donnent l'information recherchée sur la viabilité du spermatozoïde, la résultante montrée sur la figure 23 du côté droit montre qu'il est mort car la coloration est rouge.

## **DISCUSSION**

### **1. Méthodes d'élevage**

Physiologiquement, les ouvrières ne construisent qu'un nombre limité de cellules de couvain à mâles. Leur nombre utile est relativement faible. Il est possible d'amener les ouvrières à préparer plus de larges cellules via deux méthodes. La première consiste à fournir aux ouvrières un demi-cadre avec une amorce de cire d'un centimètre. Elles construisent généralement cette partie en large cellules. La seconde consiste à donner une cire gaufrée avec le motif prédéfini de cellules de mâles. La reine y pond ensuite des œufs non fécondés.

La méthodologie d'élevage a évolué afin de répondre aux besoins du protocole tout en gardant à l'esprit que la méthode doit être répétable et applicable pour les apiculteurs sans ressource laborantine. Un groupe de recherche australien a, par le passé, montré que le marquage des mâles à l'aide de marqueurs POSCA® n'entraîne pas d'agressivité particulière des ouvrières envers les mâles colorés (Rhodes et al., 2011). Nos observations concordent.

La première méthode d'élevage fut rapidement abandonnée au vu des pertes associées à l'écrasement, la surpopulation et l'envol des mâles lors de manipulations du cadre et de la cage. De plus, l'équilibre naturel de la ruche est difficile à maintenir vu que le cadre encagé occupe la place de 3 cadres.

La deuxième méthode d'élevage consistant à placer les mâles dans une ruche orpheline visait à limiter la modification de l'équilibre de la colonie mère, il est communément admis et observé qu'une ruche orpheline continue d'élever le couvain. La méthode précédemment décrite consiste à placer les cadres de couvains de mâles operculés dans une colonie orpheline forte (Wegener et al., 2014a).

Le rapport idéal ouvrière/mâle n'est pas clairement décrit dans la littérature. On parle de manière générale de 2 cadres à mâles par ruche sans préciser le nombre de cadres dans la ruche (Büchler et al., 2013). Une méthode d'élevage en condition de laboratoire a montré des résultats prometteurs avec une qualité de semence, en termes de concentration et viabilité, très satisfaisante. Dans cette situation, 1000 ouvrières accompagnent 200 faux bourdons (Ben Abdelkader et al., 2014). Une recommandation rapportée dans la littérature pour le maintien de mâles en conditions de laboratoire est de respecter le ratio 2 : 1 ouvrières-mâles (Williams et al., 2013). Lors de notre premier essai, le nombre d'ouvrières, malgré un apport renouvelé de couvain femelles, était inférieur au nombre de mâles au paroxysme des naissances. Il est également généralement recommandé d'apporter un support alimentaire artificiel continu (pollen, eau miellée, sirop, ou candi). Nous avons opté pour un apport nutritif naturel en remplaçant régulièrement le cadre de nourriture par un cadre prélevé dans la ruche mère. A la fin du mois de juin, la floraison d'été était déjà bien avancée voire presque terminée au vu d'un climat anormalement chaud et sec dès le début printemps. Il est donc possible que les ouvrières aient estimé que les ressources alimentaires étaient insuffisantes pour nourrir les mâles et ont donc négligé de les nourrir et puis tenté de les chasser. Le fait que les mâles encore vivants soient de petite taille soutient cette hypothèse. En dehors de ces conditions particulières, les ouvrières présentent un comportement

agressif envers les mâles en fin de saison, vers la fin août. Si les mâles sont enfermés dans le corps de ruche, il est recommandé de nettoyer et dégager régulièrement la grille à reine inférieure car les mâles s'y enchâssent lors de leurs tentatives de sortie de la ruche qu'ils y aient été poussés ou non (Williams et al., 2013). L'obstacle ainsi créé diminue la possibilité des ouvrières d'entrer et sortir de la ruche mais également limite la ventilation, ce qui peut impacter la santé de la colonie.

Récemment, une autre méthode d'élevage pour contrôler l'âge des mâles a été proposée. Il s'agit de limiter l'accès de la reine à 3 cadres de couvains, 2 de femelles et 1 de mâles, pendant 3 à 6 jours. Une fois la restriction levée, le cadre à mâle est laissé dans la ruche d'origine jusqu'à 24 heures avant l'émergence attendue où il est placé dans un incubateur à 37°C. Les mâles y naissent et sont ensuite encagés par 30 et replacés dans la ruche mère (Grassl et al., 2018). La réflexion sur les différentes techniques d'élevage nous a mené à adapter cette dernière méthode à nos conditions climatiques (Egyptien et al., 2019). En effet, elle est utilisée sur la côte ouest australienne où la température est plus clémente qu'en Belgique. Nous avons enfermé 1 cadre d'ouvrières partiellement pondu et un cadre à mâles non pondu au milieu du couvain et non en rive car les cadres de rive risquent de voir leur température diminuer. Le risque est particulièrement important au moment de la mise en ponte car c'est relativement tôt dans la saison, fin avril ou début mai, moment où les nuits sont fraîches. La grappe d'abeille est ainsi maintenue au centre de la ruche et la température reste stable pour l'ensemble du couvain. La grille à reine verticale est placée entre le cadre à cages et le cadre de mâles à naître. Il se trouve juste à côté du cadre de rive qui est un cadre de nourriture (figure 10). Les ouvrières restent en nombre conséquent sur le cadre à naître afin de maintenir la température du couvain et stocker de la nourriture dans les alvéoles vides. Ces cadres de rive ne sont donc pas abandonnés par les ouvrières. Après la naissance des mâles en incubateur, la méthode australienne consiste à attacher les cages dans un cadre sans cire par un système d'élastique. Les cadres à cages sont placés dans la hausse (données non publiées). En Belgique, les cages ne peuvent être placées dans la hausse car lorsque la température diminue les abeilles se resserrent en grappe au centre du corps, là où se trouve le couvain, en abandonnant la hausse. Dans nos régions, la variabilité des températures peut être importante même en été, notamment entre la nuit et la journée. Les mâles ne survivraient pas à des variations thermiques importantes. De plus, en cas de faible floraison, les abeilles ne stockent pas le miel dans les hausses et donc n'y sont présentes qu'en petit nombre. Pour ces raisons, il est évidemment préféré de conserver les mâles encagés en rive du couvain. Le système d'élastiques ne permettant pas une manipulation aisée des cages, en particulier avec des gants de protection, et comportant un risque de rupture en cas de modification de l'élasticité en lien avec la propolinisation inévitable, notre système d'attache des cadres est fait par des lattes métalliques amovibles. Ces cadres à cages (figure 9) sont plus adaptés à nos méthodes d'élevages car ils permettent une manipulation aisée, sécurisée et rapide des cages au rucher. On peut aisément encager les mâles ou les libérer en fonction de l'évolution des besoins (figure 12). Il est également possible de prendre une cage particulière sans avoir besoin d'en déplacer d'autres. On obtient ainsi des mâles d'âges connus et on ne

risque pas d'en perdre lors des manipulations suivantes de la ruche. Cette méthode d'élevage n'a pas impacté la production mellifère des ruches avec une récolte de miel normale variant de 25 à 30 kg par ruche.

La durée de vie moyenne des faux bourdons est de 20 à 40 jours (Page and Peng, 2001) avec une durée de vie maximale rapportée de 59 jours (Howell and Usinger, 1933). Lors d'essais précédents comparables aux nôtres -les mâles ne pouvaient voler librement- des durées de vies maximales ont été rapportées de 36 jours en Australie (Stürup et al., 2013) et de 9 semaines en Pologne (Woyke and Jasinski, 1979). Dans la même ligne de conduite, au Canada, une étude rapporte que 0 à 2,82 % de leurs mâles ont survécu jusqu'à l'âge de 35 jours (Rousseau et al., 2015) et en Australie, 4 % des mâles élevés durant les saisons de printemps été ont survécus jusqu'à 35 jours (Rhodes et al., 2011). Nous rapportons 57 % et 62 % de survies à l'âge de 35 jours et 9 % à 42 jours. Ces résultats sont encourageants. Nous pouvons déjà conclure que les cages ne présentent pas de risque mortel majeur pour les mâles. Cependant, au vu de la comparaison de nos résultats avec la littérature, il semble nécessaire de répéter l'expérience lors des prochaines saisons afin de confirmer nos résultats.

## **2. Collecte de semence**

La méthode employée dans ce projet est une méthode déjà décrite et employée en routine pour collecter et inséminer. L'appareil de Schley® est employé avec une seringue de Schley®. Cette seringue, la plus classiquement employée pour les récoltes de semence à fins d'insémination, ne permet pas de mesurer le volume de semence prélevé. Le volume obtenu est estimé par pipetage à l'aide d'une micropipette de 10 µL après éjection de la semence hors du capillaire dans un Eppendorf. La seringue de Harbo® (Hopkins et al., 2012; Paillard et al., 2017; Rousseau et al., 2015; Taylor et al., 2009) quant à elle permet de mesurer le volume de semence collecté. Cette seringue sera le modèle utilisé à l'avenir pour les collectes dans le cadre de nos travaux où le volume précis de sperme récolté doit être déterminé.

Il est rapporté que le pipetage de la semence joue un rôle néfaste sur la viabilité de la semence. La méthode semblant avoir le moins d'impact sur la viabilité de la semence est le rinçage des vésicules séminales dans une solution saline mais cette méthode est en revanche compliquée à appliquer. Si la comparaison de la méthode de pipetage de la semence et du rinçage du bulbe dans un dilueur montre que le pipetage a plus d'effets négatifs (Collins, 2004), la limite principale de cette méthode est l'obligation de centrifuger avant d'inséminer ou de congeler. Quand on sait que la centrifugation, de même que la congélation, diminuent la viabilité de la semence, le risque est important de voir la viabilité diminuer drastiquement après ces manipulations ; au point de compromettre l'utilisation ultérieure de la semence cryopréservée. Il existe cependant un rapport ayant testé différents protocoles de centrifugation pour évaluer leur impact sur la viabilité. Le protocole ayant les meilleurs résultats semble être 12 min à 1300 x g avec un milieu de dilution appelé « Bee Sperm Solution » (Wegener et al., 2014a). Il est donc intéressant d'étudier la question de la méthode de la collecte avant la congélation afin d'obtenir le taux de viabilité pré-congélation le plus élevé.

Le nombre de mâles qui ont donné de la semence est particulièrement faible avec une moyenne générale tout âge et toute colonie confondue de 7,6 % pour les mâles encagés et de 10,7% pour les mâles d'âges inconnus non encagés. En comparaison, Rhodes et collaborateurs (2010) rapportent un taux moyen de 59,4 % d'éjaculations variant de 38,9 % à 91,7 % en fonction de l'origine génétique et de 58,4 %, 61,8 % et 75,8 % pour 14, 21 et 35 jours respectivement. Un autre rapport montre qu'à l'âge de 20 jours, moins de 5 % des mâles éjaculaient alors que 7 jours plus tard, ce taux était de 65 % (Anderson, 2004). Une autre étude a obtenu un taux de 40 % (Collins and Pettis, 2001). Ces taux considérés comme faibles dans la littérature sont supérieurs à ceux obtenus dans notre étude. Lorsque que l'on compare le pourcentage de mâles encagés ayant éjaculé et le pourcentage de mâles non encagés ayant éjaculé les taux semblent assez similaires. Il est possible que la méthode de collecte ne permette pas de provoquer l'initiation de l'éjaculation. Stürup et collaborateurs (2013) rapportent l'utilisation du chloroforme afin de provoquer l'extériorisation partielle de l'endophallus. Cependant l'hypothèse des mauvaises conditions climatiques doit être envisagée et ce pour deux raisons. Premièrement, aucune naissance n'a eu lieu aux dates attendues. La durée de développement entre la ponte et l'émergence est en moyenne de 24 jours avec une variation de 20 à 28 jours (Winston, 1987). Winston (1987) rapporte que cette variation est majoritairement due à des fluctuations de température et d'apport alimentaire. Une diminution de la température ou d'apport alimentaire au stade larvaire retardera l'émergence. Deuxièmement, la spermatogenèse ayant lieu avant l'émergence, un déficit en apport protéique d'origine pollinique après l'émergence n'impacte pas la qualité de la semence (Stürup et al., 2013). Par contre une restriction en pollen durant le stade larvaire impacte négativement la proportion de mâles qui éjaculent et ce malgré l'éversion normale de l'endophallus, le volume se voit également significativement réduit (Czekońska et al., 2013). La météo belge au mois de mai 2019, au moment du développement larvaire des mâles, s'est montrée capricieuse avec des températures sous les normales saisonnières et donc avec une floraison erratique. Dès lors, il est possible que le développement des faux bourdons ait été compromis menant à une émergence retardée et une production de semence faible.

### **3. Coloration vitale**

Afin d'évaluer la viabilité des spermatozoïdes, des kits de colorations vitales sont disponibles dans le commerce et utilisés en routine pour la semence de mammifères. Un kit largement utilisé est le kit Vita-Eosine® (RAL-Diagnostic). Les spermatozoïdes vivants sont non colorés et les morts apparaissent rosés. Les spermatozoïdes de faux bourdons ont la particularité d'avoir un flagelle très long et une tête très petite. Ceci ne rend pas la visualisation de leur têtes aisée. Un article dont l'auteur a comparé différentes colorations vitales a montré que l'éosine – nigrosine ne donnait qu'un contraste très faible car les têtes des spermatozoïdes vivants, et donc non colorés, se confondent avec le fond. Cet article a également rapporté que l'éosine Y montre un meilleur contraste entre les morts et les vivants. Les morts sont colorés en jaune-vert et les vivants en bleu-mauve (Peng et al., 1990). Aucun rapport n'a été fait dans la littérature de l'utilisation des kits de colorations vitales de type éosine-

nigrosine pour la semence de faux bourdon. Il serait intéressant pour la suite de faire des essais avec l'éosine Y et les kits de coloration afin de comparer nos résultats avec ceux obtenus par Peng et collaborateurs en 1990.

Ces colorations vitales classiquement utilisées dans d'autres espèces ont été rapidement écartées chez l'abeille sur base de ces résultats. Des colorations utilisant des marqueurs fluorescents ont été testées avec succès afin de faciliter les analyses de viabilité sur la semence fraîche. Le contraste obtenu en microscopie à épifluorescence (Lodesani et al., 2004; Rousseau et al., 2015; Taylor et al., 2009) est net, le comptage des spermatozoïdes vivants s'en trouve facilité. La cytométrie en flux (Ciereszko et al., 2017; Czekońska et al., 2013; Paynter et al., 2014; Rzymiski et al., 2012; Tofilski et al., 2012) a pour principal avantage que le comptage est automatisé et très rapide. Il est rapporté que la cytométrie en flux montre moins de variabilité dans les résultats que le comptage par microscopie à épifluorescence (Paynter et al., 2014). Les difficultés résident principalement en son utilisation, le paramétrage des données, son accessibilité et l'interprétation des résultats sur base des populations obtenues. Afin de confirmer les résultats, de nombreux échantillons contrôles sont nécessaires (figures 16-18). Les articles ne montrent généralement ni les populations obtenues ni les échantillons contrôles, ce qui rend difficile la répétabilité des méthodes. Les populations de spermatozoïdes obtenus et décrits dans les figures 16 à 18 sont similaires à celles obtenues précédemment (Paynter et al., 2014). Leur interprétation reste cependant difficile. En effet, nous n'obtenons qu'une proportion faible de population PI hautement positive alors que les spermatozoïdes ont été traités thermiquement. Nous obtenons également deux populations SYBR-14 une hautement positive et une faiblement positive. Cette dernière a été décrite comme une population de cellules mortes par un groupe de recherche (Tofilski et al., 2012) et comme des spermatozoïdes morts par un autre (Paynter et al., 2014). Il est possible que le traitement thermique joue un rôle sur la conformation des spermatozoïdes donnant des populations de cellules variables. Il est également possible que les spermatozoïdes ne soient pas parfaitement allongés dans le flux laminaire et que à la suite de l'enroulement éventuel de certains, l'émission lumineuse détectée soit modifiée. Une autre hypothèse est que les spermatozoïdes ne soient pas répartis de manière homogène et que plusieurs d'entre eux passent en même temps devant les lasers au lieu d'un à la fois. Afin d'obtenir un contrôle positif, il serait utile de comparer différentes méthodes de modifications de conformation membranaire. Un choc osmotique à l'aide d'une solution hypotonique comme l'eau distillée ou un choc chimique à l'aide d'une solution toxique de type formaldéhyde pourrait nous permettre de vérifier si les populations obtenues sont similaires.

La microscopie à fluorescence a été testée sur un échantillon avec les marqueurs SYBR-14 et PI. Il est nécessaire de réaliser les mêmes contrôles négatifs qu'en cytométrie pour confirmer l'efficacité de la coloration. Il faudrait également pouvoir observer les spermatozoïdes avec un filtre FITC permettant d'observer les 2 émissions de coloration en même temps, la deuxième méthode consistant à superposer les images obtenues dans le vert et le rouge est plus chronophage. Le comptage n'est pas réalisé sur semence fraîche car il n'était pas initialement prévu dans le protocole de faire cette lecture. Cependant,



l'épifluorescence permettrait de mettre en parallèle les résultats obtenus par cytométrie en flux. Les sous populations de la cytométrie sont potentiellement observables en épifluorescence. Il est possible que la deuxième population SYBR-14 observée soit une population de cellules en train de mourir ou avec une conformation membranaire modifiée qui permet une prise partielle de PI. En observant, les cellules qui ont une double coloration évidente, un pattern éventuel pourrait être mis en évidence. A nouveau, en croisant ces informations avec d'autres méthodes de modification membranaire, nous espérons pouvoir soumettre une interprétation détaillée des résultats. La double coloration a déjà été décrite précédemment chez le faux bourdon et chez les mammifères (Collins and Donoghue, 1999; Gączarzewicz et al., 2015) sans développer avec précision l'explication de cette double coloration. Il est suspecté par ces auteurs que ces spermatozoïdes soient en dégénérescence avec une membrane modifiée mais toujours vivants. Une coloration qui met en évidence des signes précoces d'apoptose (Annexine V) pourrait éventuellement étayer cette hypothèse.

## **Bibliographie**

- Al-Lawati, H., Kamp, G., Bienefeld, K., 2009. Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. *J. Insect Physiol.* 55, 117–122.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.10.010>
- Anderson, D., 2004. Improving Queen Bee Production RIRDC 04/153. RIRDC Rep. 23.
- Ben Abdelkader, F., Kairo, G., Tchamitchian, S., Cousin, M., Senechal, J., Crauser, D., Vermandere, J.P., Alaux, C., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Barbouche, N., Brunet, J.L., 2014. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie* 45, 215–223. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0240-7>
- Büchler, R., Andonov, S., Bienefeld, K., Costa, C., Hatjina, F., Kezic, N., Kryger, P., Spivak, M., Uzunov, A., Wilde, J., 2013. Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.* 52, 1–30. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.07>
- Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G.J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S., Karol, H., 2017. Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie* 48, 211–222.  
<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0466-2>
- Cobey, S.W., Tarpy, D.R., Woyke, J., 2013. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.* 52, 1–18. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.09>
- Collins, A.M., 2004. Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination. *Invertebr. Reprod. Dev.* 45, 231–237.  
<https://doi.org/10.1080/07924259.2004.9652594>
- Collins, A.M., Caperna, T.J., Williams, V., Garrett, W.M., Evans, J.D., 2006. Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Mol. Biol.* 15, 541–9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00674.x>
- Collins, A.M., Donoghue, A.M., 1999. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology* 51, 1513–1523. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00094-1)
- Collins, A.M., Pettis, J.S., 2001. Effect of varroa infestation on semen quality. *Am. Bee J.* 590–593.
- Couvillon, M.J., Hughes, W.O., Perez-Sato, J.A., Martin, S.J., Roy, G.G., Ratnieks, F.L., Leon Amatlan de los Reyes, M., 2010. Sexual selection in honey bees: colony variation and the importance of size in male mating success. *Behav. Ecol.* 21, 520–525.  
<https://doi.org/10.1093/beheco/arq016>
- Crane, E., 1999. *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*, 1999th ed. New York.
- Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., Chorbiński, P., 2013. The Influence of Honey Bee (*Apis Mellifera*) Drone Age on Volume of Semen and Viability of Spermatozoa. *J. Apic. Sci.* 57, 61–66. <https://doi.org/10.2478/jas-2013-0007>
- Egyptien, S., Brutinel, F., Ponthier, J., Deleuze, S., 2019. Optimizing drone raising and marking techniques in Belgium: a report., in: 46th Apimondia International Apicultural Congress. Montreal.
- Gączarzewicz, D., Udała, J., Piasecka, M., Błaszczuk, B., Stankiewicz, T., 2015. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turkish J. Biol.* 39, 582–594.  
<https://doi.org/10.3906/biy-1412-76>
- García-Vázquez, F., Gadea, J., Matás, C., Holt, W., 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J. Androl.* <https://doi.org/10.4103/1008->

- Grassl, J., Holt, S., Cremen, N., Peso, M., Hahne, D., Baer, B., 2018. Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity. *J. Invertebr. Pathol.* 159, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.005>
- Hopkins, B.K., Herr, C., 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie* 41, 548–556. <https://doi.org/10.1051/apido/20010006>
- Hopkins, B.K., Herr, C., Sheppard, W.S., 2012. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 1079–1083. <https://doi.org/10.1071/RD11088>
- Howell, D.E., Usinger, R.L., 1933. Observations on the flight and length of life of drone bees., *Annals of the Entomological Society of America*.
- Hrassnigg, N., Crailsheim, K., 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*) 1. *Apidologie* 36, 255–277. <https://doi.org/10.1051/apido:2005015>
- Koeniger, G., Koeniger, N., Phiangcharoen, M., 2011. Comparative reproductive Biology, in: Radloff, S.E., Hepburn, H.R. (Eds.), *Honeybees of Asia*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1–669. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16422-4>
- Koeniger, G., Wissel, M., Herth, W., 1990. Cornual secretion on the endophallus of the honeybee drone (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 21, 185–191.
- Leclercq, G., Gengler, N., Francis, F., 2018. How human reshaped diversity in honey bees (*Apis mellifera* L.): a review. *Entomol. Faun. Entomol.* 71, 1–13. <https://doi.org/10.25518/2030-6318.4050>
- Lino-Neto, J., Bao, S.N., Dolder, H., 2000. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell* 32, 322–327. <https://doi.org/10.1054/tice.2000.0119>
- Lodesani, M., Balduzzi, D., Galli, A., 2004. Functional characterisation of semen in honeybee queen (*A.m.ligustica* S.) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination. *Ital. J. Anim. Sci.* 3, 385–392. <https://doi.org/10.4081/ijas.2004.385>
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., de Paz, P., 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 67–78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>
- Page, R.E., Peng, C.Y.-S., 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* 36, 695–711. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9)
- Paillard, M., Rousseau, A., Giovenazzo, P., Bailey, J.L., 2017. Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *J. Econ. Entomol.* 110, 1412–1418. <https://doi.org/10.1093/jee/tox149>
- Paynter, E., Baer-imhoof, B., Linden, M., Lee-pullen, T., Heel, K., Rigby, P., Baer, B., 2014. Flow Cytometry as a Rapid and Reliable Method to Quantify Sperm Viability in the Honeybee *Apis mellifera*. *Cytom. Part A - Jounal Int. Soc. Adv. Cytom.* 85A, 463–472. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22462>
- Peng, Y. -S, Locke, S.J., Nasr, M.E., Liu, T.P., Montague, M.A., 1990. Differential staining for live and dead sperm of honey bees. *Physiol. Entomol.* 15, 211–217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00509.x>
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353.

<https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

- Rhodes, J.W., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D.L., Wheen, G., 2011. Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie* 42, 29–38. <https://doi.org/10.1051/apido/2010026>
- Rotschild, 1954. The spermatozao of the honey bee. *Trans. R. ent. Soc. Lond.* 197, 289–294.
- Rousseau, A., Fournier, V., Giovenazzo, P., 2015. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *Can. Entomol.* 147, 702–711. <https://doi.org/10.4039/tce.2015.12>
- Rzymiski, P., Langowska, A., Fliszkiewicz, M., Poniedziałek, B., Karczewski, J., Wiktorowicz, K., 2012. Flow cytometry as an estimation tool for honey bee sperm viability. *THE* 77, 1642–1647. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.009>
- Schlüns, H., Schlüns, E.A., Van Praagh, J., Moritz, R.F.A., 2003. Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie* 34, 577–584. <https://doi.org/10.1051/apido:2003051>
- Stürup, M., Baer-Imhoof, B., Nash, D.R., Boomsma, J.J., Baer, B., 2013. When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behav. Ecol.* 24, 1192–1198. <https://doi.org/10.1093/beheco/art049>
- Taylor, M.A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., Buhr, M.M., 2009. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology* 72, 149–159. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.02.012>
- Tofilski, A., 2014. A scientific note on amoeboid movement of honey bee semen. *Apidologie* 45, 637–640. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0269-2>
- Tofilski, A., Chuda-Mickiewicz, B., Czekońska, K., Chorbiński, P., 2012. Flow cytometry evidence about sperm competition in honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 43, 63–70. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0089-6>
- Van Engelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80–S95. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.06.011>
- Vanengelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS One* 4, 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- Vasfi Gençer, H., Kahya, Y., 2011. Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *J. Apic. Res.* 50, 130–137. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.2.04>
- Wegener, J., May, T., Gu, G., Kamp, G., Bienefeld, K., 2014a. New Methods and Media for the Centrifugation of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *J. Econ. Entomol.* 107, 47–53. <https://doi.org/10.1603/EC13159>
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., Bienefeld, K., 2014b. A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology* 69, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.011>
- Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G., Müller, K., Bienefeld, K., 2012. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology* 65, 126–131. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2012.04.010>
- Weybright, S., 2016. Importing frozen honey bee sperm is key to conservation [WWW Document]. Washingt. State Univ. URL <https://news.wsu.edu/2016/07/25/importing-frozen-honey-bee->

sperm-key-conservation/ (accessed 1.27.19).

- Williams, G.R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D.P., Medrzycki, P., Murray, T.E., Natsopoulou, M.E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R.J., Pernal, S.F., Shutler, D., Tanner, G., Van Der Steen, J.M., Brodschneider, R., 2013. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *J. Apic. Res.* 52, 1–36. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>
- Winston, M.L., 1987. Development and Nutrition, in: *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, p. 281.
- Woyke, J., Jasinski, Z., 1979. Influence of age of drones on the results of instrumental insemination of honeybee queens. *Apidologie* 9, 203–212.

Tableau 1 : Dates attendues vs observées des naissances des mâles encagés et différence entre les deux.

Colonie n°	Naissance attendues	Naissances observées	Retard
N1	Du 1 au 3 juin	Du 4 au 6 juin	4 jours
N2	Du 1 au 3 juin	Du 7 au 9 juin	6 jours
N4	Du 23 au 25 mai	Du 25 au 27 juin	3 jours

Tableau 2: Nombre de mâles encagés par cage, par colonie et par date.

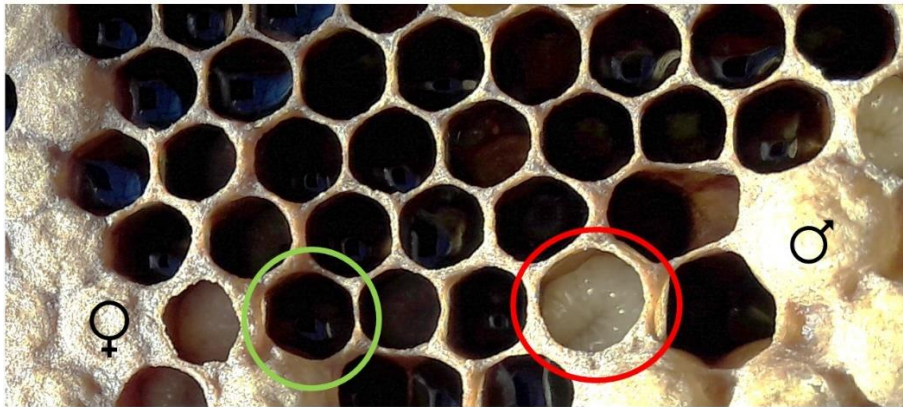
Colonie n°	Jour 1	Jour 2	Jour 3
N1	1x 25 mâles	8x 35mâles 1x 25 mâles	1x 35 mâles
N2	2x 35 mâles	2x 35 mâles	1x 35 mâles 1x 34 mâles
N4	1x 18mâles	1x 30 mâles 1x 34 mâles	1x 35 mâles

**Tableau 3:** Pourcentage de mâles survivants en fonction de l'âge et de la colonie, nombre de mâles ayant éjaculé en fonction de l'âge et de la colonie ainsi que le volume obtenu au total et poids moyen des mâles post-extériorisation du système reproducteur.

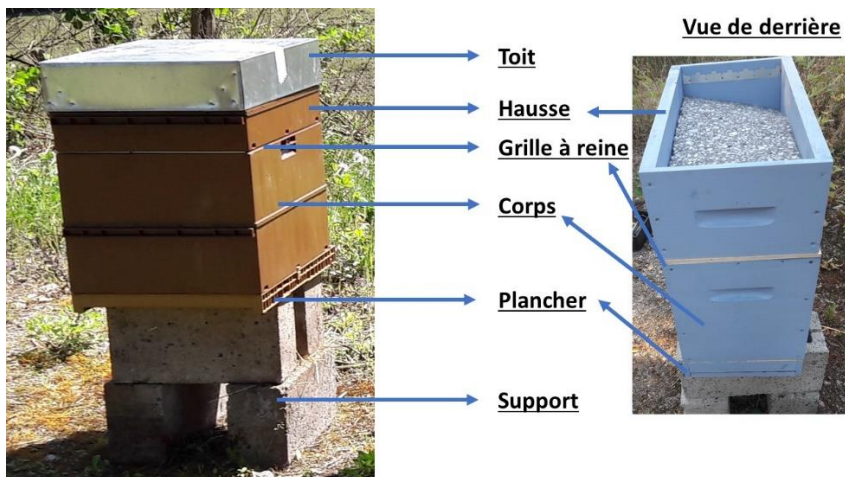
Colonie n° + âge	Nombres de mâles vivants	Nombres de cadavres	Nombres de mâles encagés	Nombre de mâles avec semence	Volume de semence total (µL)	Poids moyen (g)
N1 - J28	111 (79,3%)	21	140	2 (2%)	0,4	0,164
N1 - J35/36	100 (62,5%)	59	160	5 (5%)	/	0,179
N2 - J28	33 (47,1%)	34	70	3 (9%)	0,5	0,201
N2 - J35/36	79 (56,8%)	70	139	22 (28%)	15	0,195
N4 – J41/42	9 (9,1%)	85	99	0 (0/9)	0	0,194

**Tableau 4:** Nombre de mâles immatures, nombre de mâles ayant éjaculé, ainsi que le volume obtenu au total et le poids moyen des mâles post-extériorisation du système reproducteur en fonction de la colonie.

Colonie n° + âge	Nombres de mâles crochets orangés	Nombres de mâles crochets transparents	Nombre de mâles avec semence	Poids moyen (g)	Poids moyen mâles avec semence (g)
Extérieure 1	23/38	15/38	1 (4%)	0,218	0,208
Extérieure 2	50/55	5/55	6 (12%)	0,226	0,208
Extérieure 3	60/62	2/62	5 (8%)	0,189	0,189
N1	120/123	3/123	23 (19%)	0,208	0,213



**Figure 1 :** Aspect du couvain ouvert et fermé. A gauche on voit du couvain de femelle operculé, à droite du couvain de mâle operculé. Les cellules de femelles sont plus petites que celles de mâles, les opercules de femelles sont planes et celles de mâles sont bombées. Au milieu, entouré en vert, on voit un œuf. Entouré en rouge, on observe une larve de mâle.



**Figure 2 :** A gauche : Configuration d'une ruche Dadant 10 cadres vue de derrière. A droite : configuration d'une ruchette Dadant 6 cadres.



**Figure 3 :** A gauche : Cadre à ouvrière non étiré placé en cage. A droite : le cadre de corps encagé est placé dans la ruchette à côté d'un cadre de corps. La cage étant très large, le passage des abeilles est limité, il est donc décidé de laisser un espace de part et d'autre de la cage.



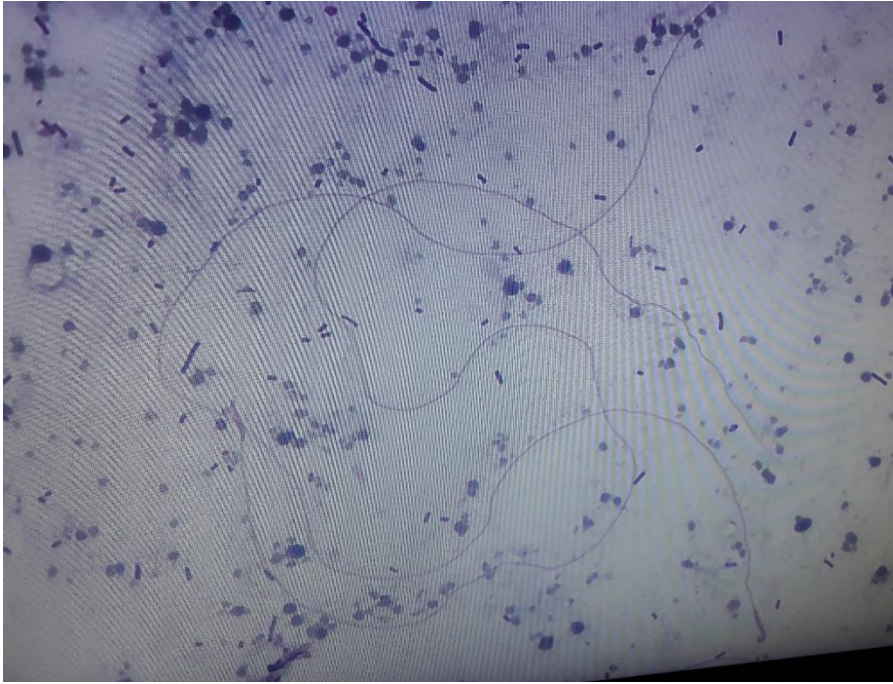


Figure 4 : Deux spermatozoïdes sont observés au microscope, grossissement 400x. La tête est difficilement différenciable du flagelle.

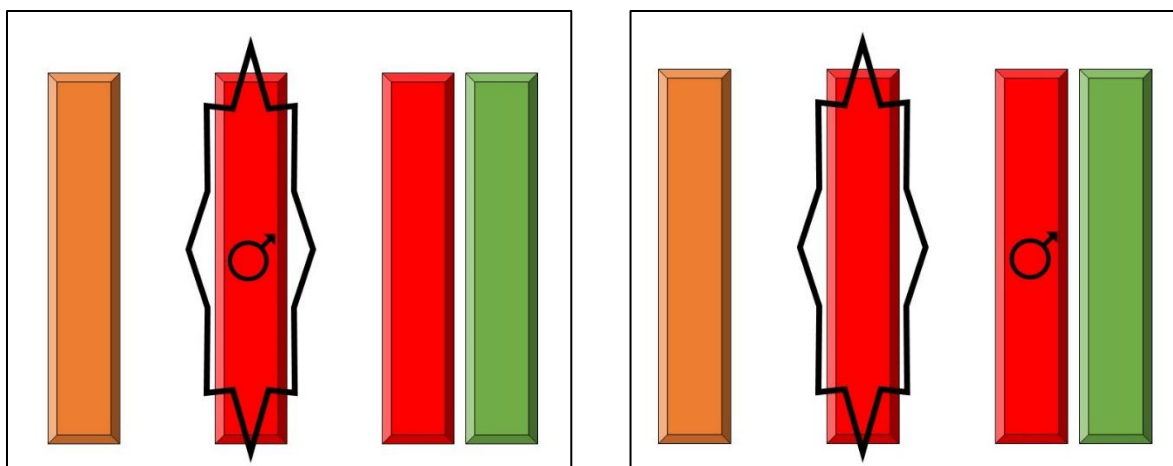
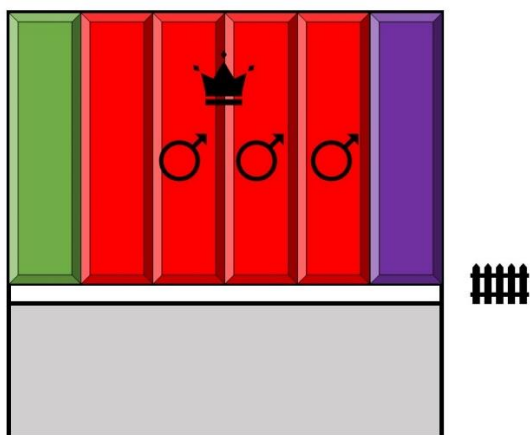


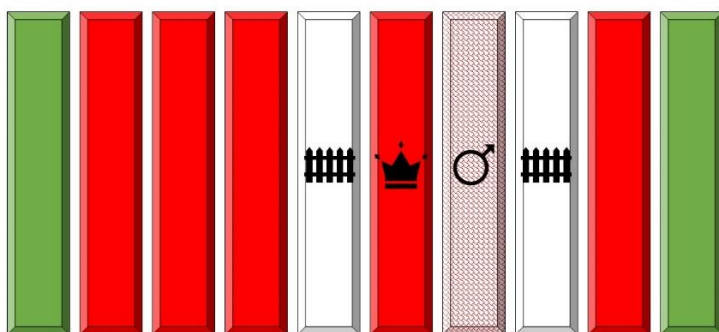
Figure 5 : A gauche : Schéma de la ruchette d'élevage orpheline avec le cadre de couvain à mâle encagé. A droite : Schéma de la ruchette orpheline avec le cadre d'élevage qui est un cadre de couvain d'ouvrières sur lequel on vient placer et enfermer les mâles nouvellement marqués. En orange : cadre à étirer, en rouge : cadre de couvain, en vert : cadre de nourriture.



Figure 6 : Les mâles sont marqués tous les jours directement sur le cadre sans manipulation des individus. Les cadres sont ensuite replacés dans la ruche avec une grille à reine entre le corps de ruche et la hausse de plancher.



**Figure 7 :** Schéma de la ruchette pour la méthode d'élevage en ruchette orpheline. La ruchette est placée sur la hausse de plancher (gris). Entre les deux, la grille à reine (barrière) empêche la sortie de la reine et des mâles. Un cadre de nourriture (vert), 1 cadre de couvain d'ouvrières (rouge), 3 cadres de mâles (rouge avec symbole mâle) et un cadre de partition composent le corps de ruchette.



**Figure 8 :** Configuration du corps de ruche lors de la mise en ponte du cadre de couvain à mâle. Le cadre avec les vagues et le symbole mâle représente le cadre à mâles étiré non encore pondue. La reine est sur un cadre de couvain à ouvrières placé avec le cadre à étirer entre 2 grilles à reine verticales. Les rectangles rouges représentent des cadres de couvain et les verts des cadres de nourriture.



**Figure 9 :** Cadre à cages : les cages sont amovibles et modulables. Les mâles restent enfermés de l'émergence à la collecte.

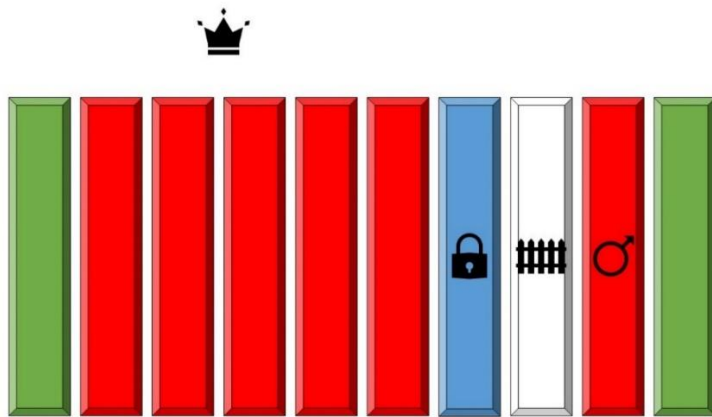


Figure 10 : Configuration du corps de ruche au moment de la mise en cage des mâles. Les rectangles verts représentent les cadres de nourriture. Les rectangles rouges sont les cadres de couvains. La couronne représente la reine qui est cloîtrée du côté du couvain d'ouvrières. Le rectangle bleu figure le cadre à cages et le blanc celui de la grille à reine qui empêche tout mouvement de la reine et des mâles de part et d'autre. Le rectangle rouge avec le symbole mâle est le cadre à mâles.

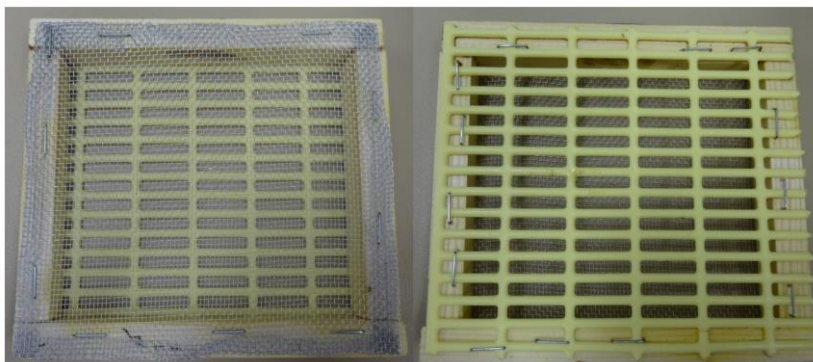


Figure 11 : A gauche : face latérale de la cage : moustiquaire métallique qui ne permet pas le passage des abeilles. A droite : face médiale de la cage : grille à reine qui permet le passage des ouvrières mais pas celui des mâles.



Figure 12 : Vue de haut de la cage à mâles. La grille de fermeture pivote sur une vis afin de pouvoir faire entrer et sortir les mâles. Cette partie est déposée sur le bord inférieur du cadre à cages afin d'éviter toute ouverture et ainsi éviter le risque de perte de mâles.





**Figure 13 :** Une pression exercée sur la tête et le thorax provoque l'éversion partielle du système reproducteur. Après une pression longitudinale sur l'abdomen si le mâle est mature, le bulbe apparaît. Une attention toute particulière est donnée à éviter tout contact entre le système reproducteur et les doigts ou une partie de l'insecte afin d'éviter la contamination bactérienne.



**Figure 14 :** Le système reproducteur est éversé. A gauche : absence de semence, seul le mucus blanc (flèche noire) nacré est observé. A droite : présence de semence de couleur crème (flèche bleue) qui repose sur le mucus blanc (flèche noire). Les crochets sont de couleur orangée.

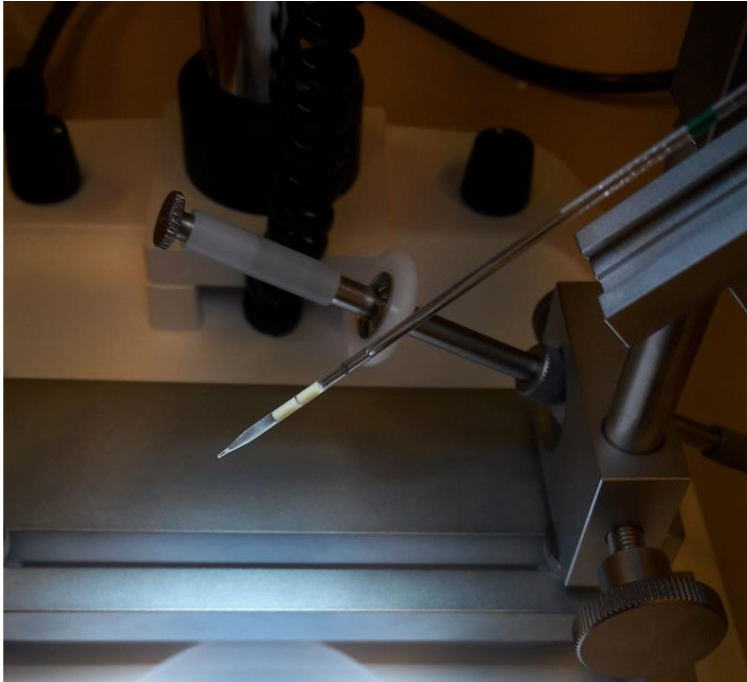


Figure 15 : La seringue de Schley® avec la récolte de semence de 2 faux-bourbons.

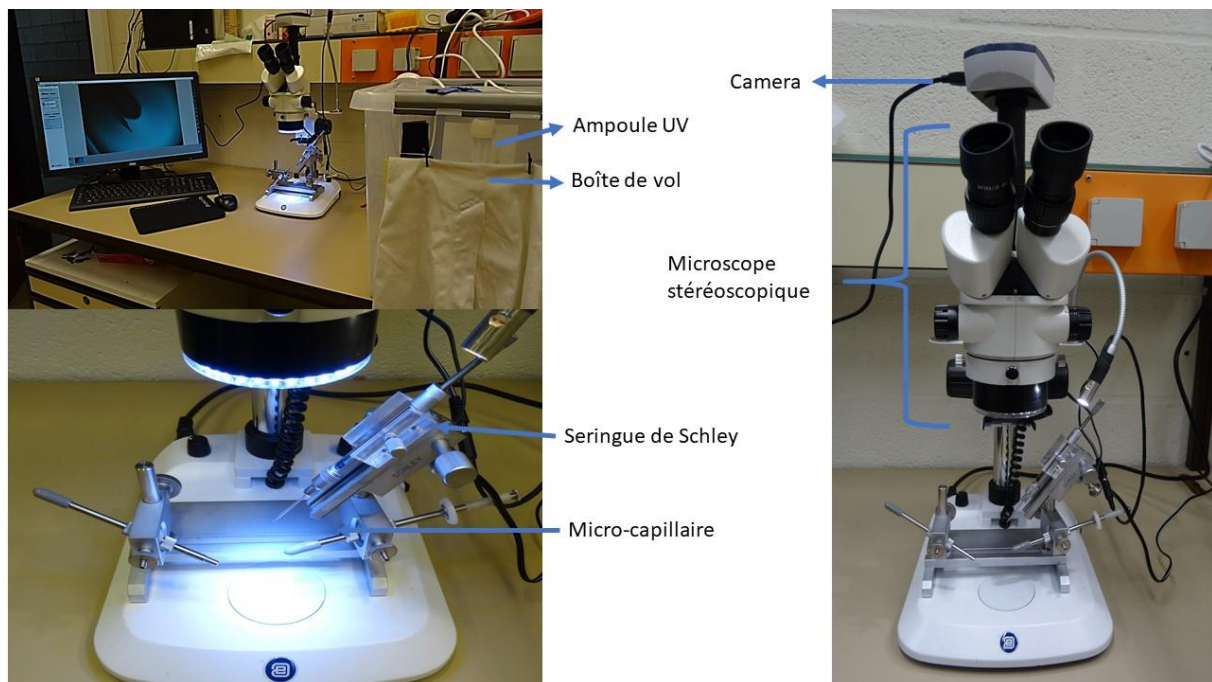


Figure 16 : Appareil de Schley®. En haut à gauche vue d'ensemble : l'ordinateur relié à la caméra permet d'enregistrer des images, le microscope avec l'appareil de Schley® et la boîte de vol avec la lampe UV. En bas à gauche : vue de l'appareil de Schley® en lui-même. A droite, l'appareil de Schley® et le microscope, la caméra est reliée à l'ordinateur, une source de lumière supplémentaire est visible.

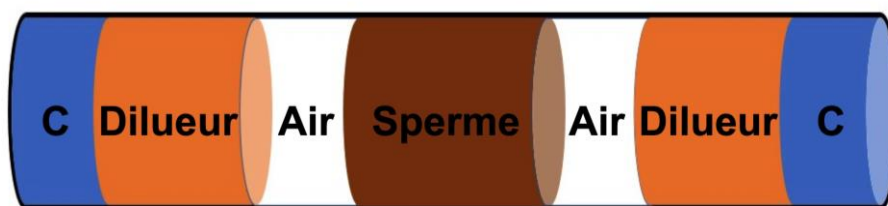


Figure 17 : Configuration du montage des paillettes pour la congélation. Le bleu (C) représente les bouchons de crystaseal.

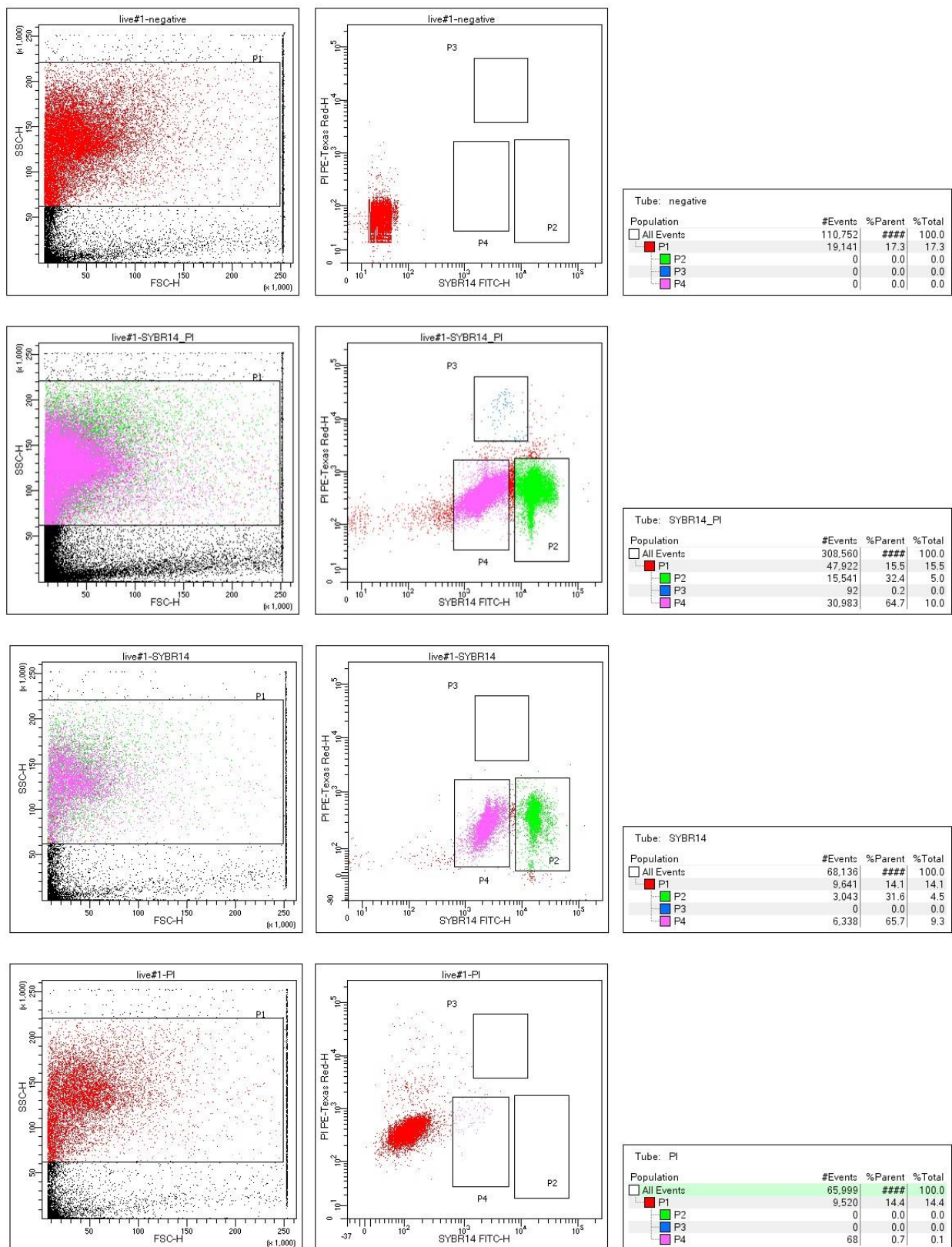


Figure 18 : Les mâles ont été chassés de la ruche et encombrent la grille à reine placée entre la hausse de plancher et le corps de ruche





Figure 19 : Micro-capillaire pour congeler la semence au lieu d'une paillette de 250  $\mu$ L



**Figure 20 :** Résultats de cytométrie (colorations SYBR-14 et PI) spermatozoïdes non traités thermiquement : 2 populations SYBR positives sont présentes (P2 et P4). Une population PI positive est peu visible (P3).

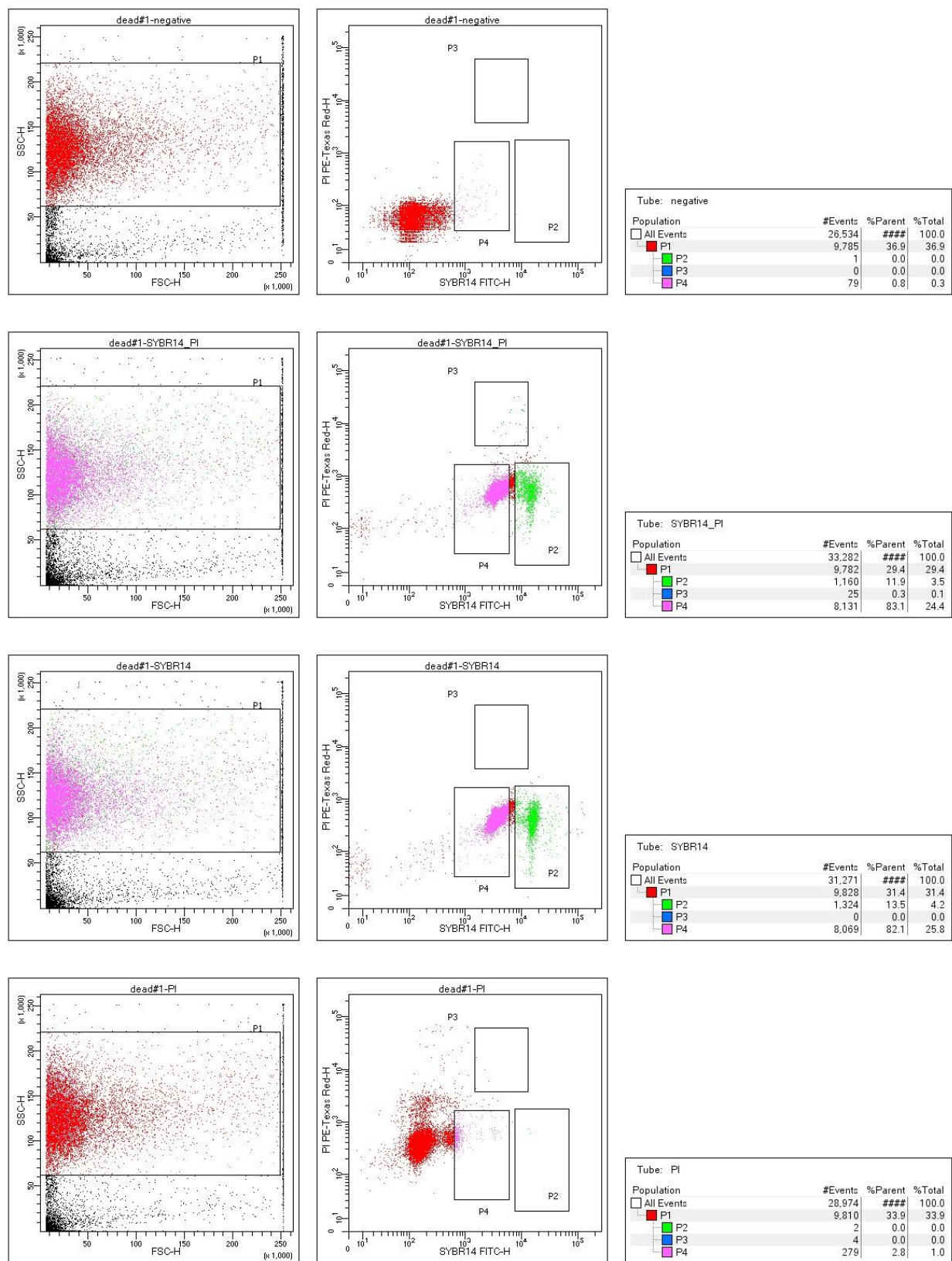
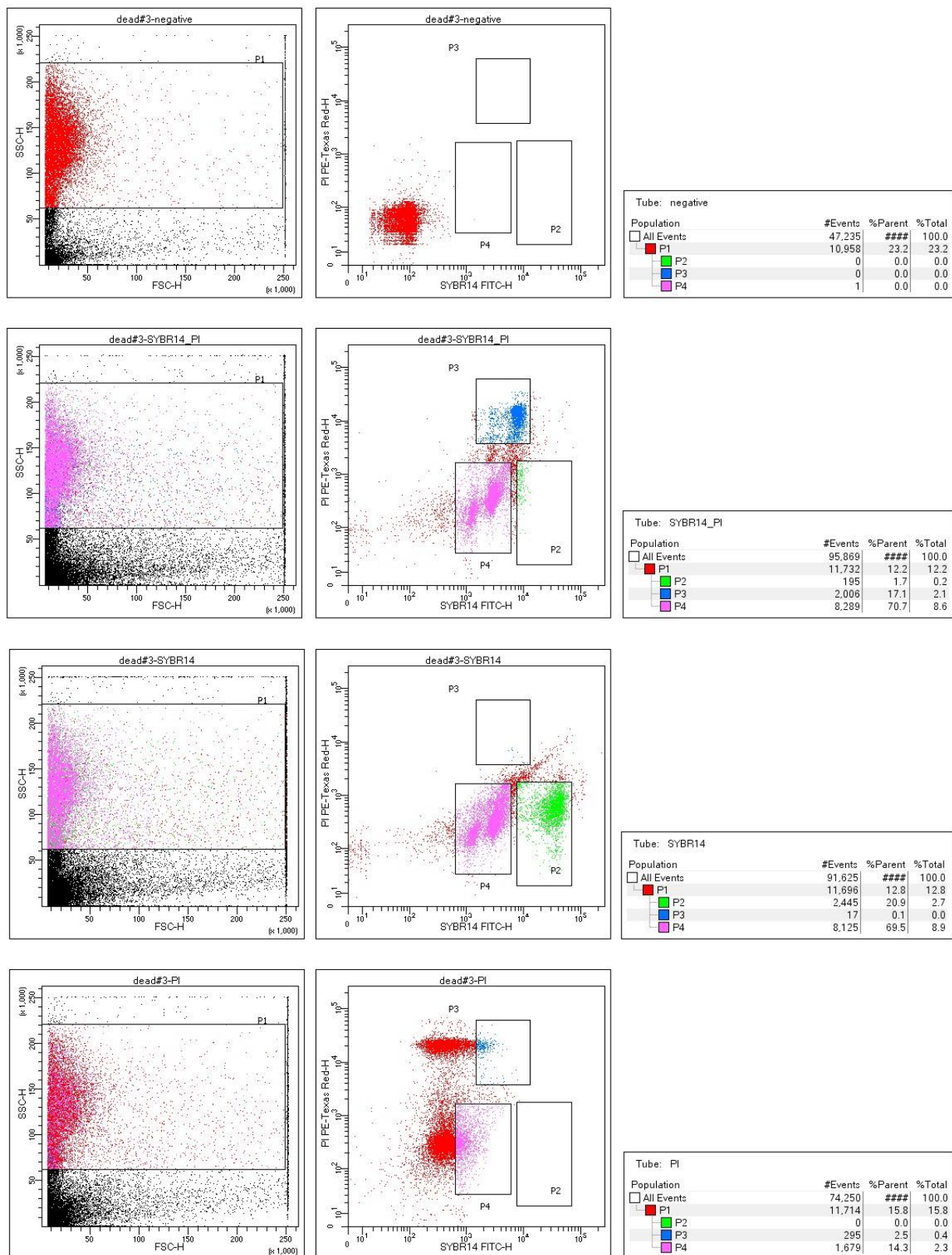
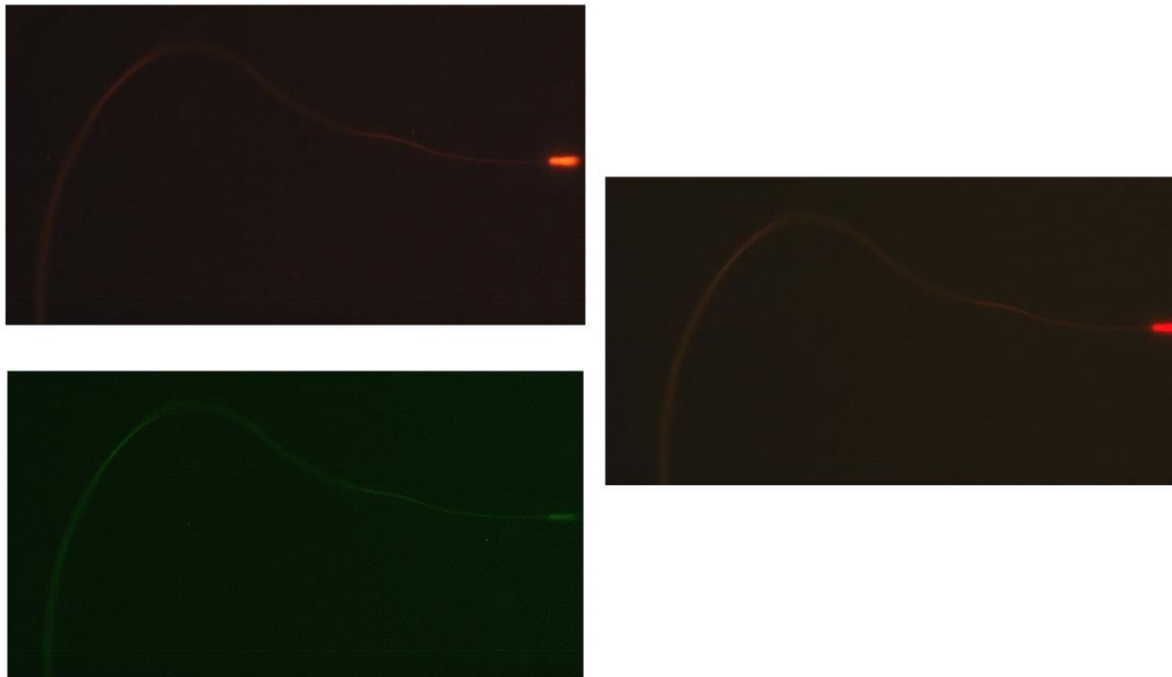


Figure 21 : Résultats de cytométrie (colorations SYBR-14 et PI) spermatozoïdes traités thermiquement à 60 °C : 2 populations SYBR positives sont présentes (P2 et P4). La population PI (P3) n'est pas clairement présente malgré un échantillon théoriquement mort.





**Figure 22 :** Résultats de cytométrie (colorations SYBR-14 et PI) spermatozoïdes traités thermiquement à l'azote liquide puis chauffés à 60 °C : 2 populations SYBR positives sont présentes (P2 et P4). La population PI (P3) est clairement présente mais les paramètres utilisés précédemment semblent ne pas correspondre aux populations obtenues avec cet échantillon.



---

Figure 23 : Coloration vitale en utilisant la microscopie à fluorescence. Le SYBR-14 visible dans le vert (en bas à gauche) le PI visible dans le rouge (en haut à gauche) et la superposition des 2 images (à droite) qui montre que le spermatozoïde est PI positif et donc mort.